

## 特集 臓器再生

組織工学を用いて生体外で再構成された  
3次元皮膚代替物の進歩

昭和大学豊洲クリニック美容・形成外科

昭和大学医学部形成外科学教室

加王 文祥

再生医療における皮膚代替物とは、皮膚由来細胞を体外において培養、増殖したのち3次元構成して作製する。皮膚代替物には主として表皮代替物（以下人工表皮）、真皮代替物（以下人工真皮）、人工真皮上に人工表皮を載せた2層構造のもの（以下人工皮膚）がある（Fig. 1）。皮膚の構造は表面より表皮、真皮、皮下組織（皮下脂肪）であり、それぞれ主体となる細胞成分、組織構造に大きな違いを認める。したがって人工皮膚を作製することは複数の細胞成分による異なった組織構造を持つ複合組織を作製することになる（Fig. 2）。

## 1. 再生医療における皮膚代替物の種類

## 1) 人工表皮

表皮を構成する主たる細胞はケラチノサイト（表皮角化細胞）である。表皮はケラチノサイトが重層化して構成され、ほとんど細胞外基質（Extra Cellular Matrix: ECM）がない。1975年にRheinwaldとGreen<sup>1)</sup>によってヒトケラチノサイトが生体外でマウス由来の3T3細胞をフィーダーレイヤーとして用いて培養できることが始めて報告され、現在では表皮細胞用の培地に改良が加えられ3T3細胞を用いなくても細胞培養ができるようになった。人工表皮を作製するには通常表皮基底層にあるケラチノサイトを採取して培養、増殖するが、体外においてケラチノサイトを重層化、角化させるには底面を培養液中に漬け、表面を空気にさらす環境（air liquid interface）に置く必要がある。

シート状の自己人工表皮は既に臨床用に製品化されており<sup>2)</sup>、本邦でもジェイス®（ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）として重傷熱傷の

治療に用いられている（Fig. 3）。

## 2) 人工真皮

真皮を構成する主たる細胞はファイibroblast（真皮線維芽細胞）である。真皮はファイibroblastが、自身が分泌したコラーゲン、エラスチンなどで構成されるECM内に散在して構成される。人工真皮を作製するには通常真皮由来のファイibroblastを採取して、ECMに相当する担体と混合して培養、増殖する。

人工真皮は海外において既に同種、自己線維芽細胞を含むものが臨床用に製品化されており、線維芽細胞から放出されるサイトカインや成長促進因子などによる肉芽組織の形成促進作用を期待して、糖尿病による難治性潰瘍や熱傷治療に使用されており、本邦でも一部の大学病院で高度先進医療としての治療が開始された。

## 3) 皮下組織代替物

皮下組織（皮下脂肪）を構成する主たる細胞はアディポサイト（脂肪細胞）である。皮下組織の再生は、脂肪細胞の増殖分化のタイミングが難しく、また脂肪細胞に分化させることができて正常な大きな一つの脂肪滴を持つ脂肪細胞ではなく、細胞質内に細かな脂肪滴が散在する脂肪細胞にしかならなかった。

最近皮下組織の作製に成功した報告があり、これを見ると<sup>3,4)</sup>脂肪組織に存在して、脂肪細胞の前駆細胞として機能するのみならず、脂肪、骨、軟骨といった間葉系細胞への、多分化能を持つ細胞脂肪由来幹細胞（adipose-derived stem/stromal cells）（以下ASCs）を用いていた。残念ながら完全な皮下脂肪層が作製できたわけではなく、真皮組織様の構造

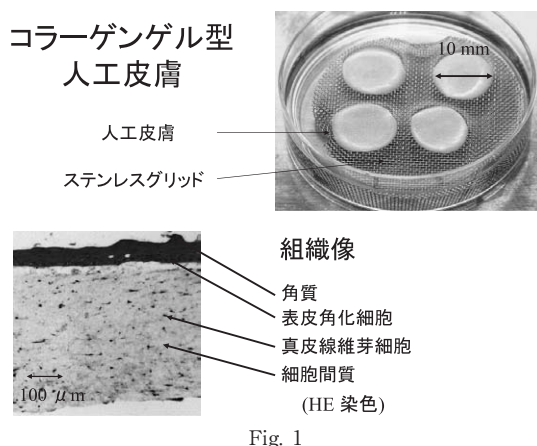


Fig. 1

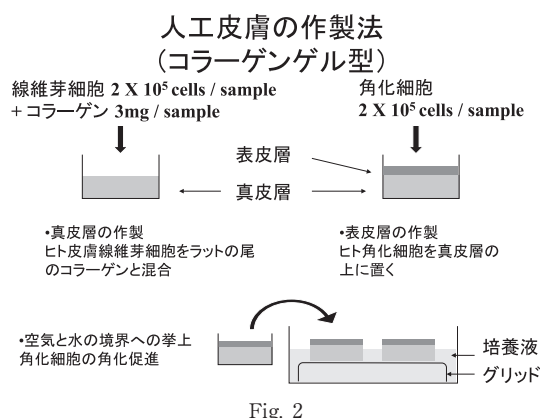


Fig. 2



Fig. 3

で臨床用に製品化されたものは同種細胞を用いた皮膚のみであり、自己細胞を用いての人工皮膚は未だ実験室レベルでの作製に留まっている。

## 2. 研究室レベルでの皮膚代替物

皮膚を構成する細胞は今まで述べた主たる細胞の他にも多種の細胞がある。再生医療における皮膚代替物は細胞を体外において培養、増殖したのち3次元構成して作製するので、使用する目的に合わせて作製の際に各種の細胞を任意の割合で加えることが可能である。

以下にいくつかの例を述べる。

### 1) メラノサイト

表皮層を作る際にメラノサイトを混合することにより、メラノサイトとそこから分泌されたメラニン顆粒がケラチノサイトに含まれる表皮層を作製することが出来る。メラノサイト入り人工表皮と人工皮膚は化粧品開発におけるメラニン合成、美白試験材料として広く利用されており、既に本邦においてもジャパン・ティッシュ・エンジニアリングやクラボウより商業的に生産供給されている (Fig. 4)。

内に正常な脂肪細胞が散在するといった組織像であるが、今後の進歩が期待される。

### 4) 人工皮膚

今のところ表皮、真皮、皮下組織を含む人工皮膚は作製されておらず、一般に人工皮膚とは人工真皮上に人工表皮を載せた2層構造のものを指す。

培養した皮膚細胞の移植に関する研究が進歩するにつれ、ケラチノサイトとファイブプロラストとの相互作用が、皮膚という器官としての再構築に重要であることがわかってきた。いまだ相互作用については明らかな部分が多いが、表皮細胞が皮膚内にある各種細胞の増殖を調節しているという報告<sup>5)</sup>や、繊維芽細胞が表皮細胞の角化に関与しているとの報告がある。

そのため全層皮膚欠損創には表皮と真皮成分の両者が存在する人工皮膚の使用が望ましいが、現時点

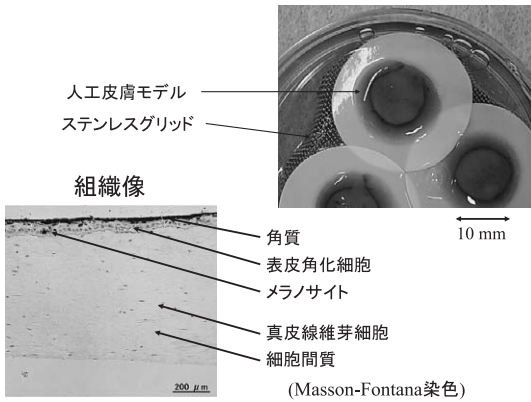


Fig. 4

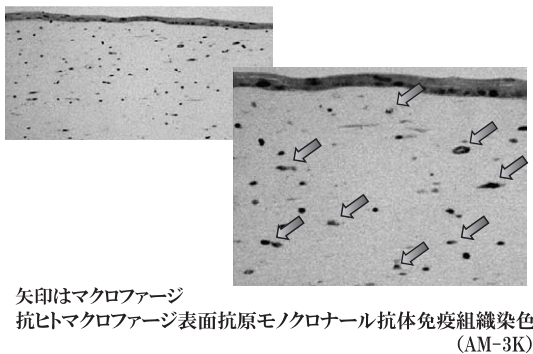


Fig. 5

## 2) 炎症細胞

真皮層を作る際に線維芽細胞のほかに血液由来の単球を加えると真皮層内にマクロファージを含む真皮層を作製することが出来る。これを用いて塚原ら<sup>6)</sup>は皮膚創傷治癒における炎症細胞の役割をシミュレーション出来ることを報告した (Fig. 5)。

## 3) 血管

真皮層を作る際に線維芽細胞のほかに正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC) を加えると毛細血管様の管腔構造を持った真皮層を構築することが出来る<sup>7)</sup>。

## 3. 人工皮膚の用途

### 1) 臨床

臨床における人工表皮、人工皮膚の用途は皮膚構造物としての欠損部の充填のほか、内部に含まれる細胞成分が放出するさまざまなサイトカイン類や、

成長促進因子による創部の創傷治癒過程の促進がある。

重傷熱傷、広範囲母斑、刺青切除後の皮膚欠損部の充填には従来植皮術が行われてきたが、採皮出来る範囲により手術できる範囲が制限される。そのため手術を複数回に分けたり、機能的、整容的には不利であっても植皮片を網目状にして移植したりしてきた。現在においてもこれらの疾患の皮膚欠損部に人工表皮シートを使用して創傷治癒課程の促進を行い良好な結果を得ているが、今後は人工皮膚が、欠損部へ皮膚構造物として生着することが期待されている。

### 2) 動物実験代替物

近年皮膚代替物は薬の研究開発や化粧品などの試験における動物代替法としても注目されている。薬の研究開発では皮膚刺激性試験、皮膚腐食性試験などが必要であり、化粧品の開発では皮膚水分量、水分蒸散量測定、セラミド解析などが必要である。今までこれらの試験には動物や実際の患者の皮膚を用いてきたが、どちらの方法も完全に満足できるものではなかった。

ラットや豚の皮膚が動物を用いた試験ではよく使われるが、近年の動物愛護意識の高まりにより各種の制限が加えられるようになった。また創傷治癒の反応がヒトと完全には同じではないために、動物皮膚を用いた実験の結果をそのまま臨床の場でヒトの皮膚に当てはめられないということも問題である。

この点は実際の患者の皮膚を使えば解決出来るが、一人の被験者から得られる研究に用いることが出来る皮膚の範囲に限度がある。通常顔面や腹部の除皺術の際に得られる余剰切除皮膚を用いるが、多様な創傷治癒条件を比較するような同時に多くの均一な皮膚を必要とする研究に用いることはできない。さらにヒト由来試料ではその提供者、家族等の関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分に配慮する必要がある。十分量の試料が得られなくなりつつあるのが実情である。これらの状況により最近では皮膚代替物を用いた毒性試験や皮膚創傷治癒研究が一般化してきた。

皮膚代替物による試験は目的に応じて標本の大きさ、厚み、細胞密度を設計出来るのみならず、炎症細胞やサイトカインなどの創傷治癒反応に関与する因子をも付加または除去する事が出来る。同時に多

数の均一な標本を試験に供することが出来る点も優れている。ヒト皮膚細胞を使用している点において動物の皮膚モデルよりも、同時に多数の均一な標本をテスト出来るという点で実際の患者皮膚を用いることよりも優れている。

しかしながら現時点ではどの試験にはどのような皮膚代替物を使用するか、さらにどのような方法で試験を行うかを標準化している最中であり今後の進展が待たれている。

#### 4. 挑戦すべき課題

組織工学的手法を用いて皮膚のような複合組織を作製するには以下のような挑戦すべき課題がある。

##### 1) 細胞

使用する細胞の由来としては同種と自己がある。臨床においては自己細胞を利用することは生着が期待でき安全であるため理想ではあるが、細胞の増殖には時間がかかる。実際ジェイス®を重傷熱傷のように生命の危機を伴う患者に使用する場合、培養表皮シート作製には約4週間かかる。このため患者から培養のための皮膚を採取して細胞増殖を開始したが、人工表皮が出来上がり使用する前に患者の状態が悪化して患者が亡くなってしまうことがしばしば起こっている。

このような場合生体包帯 (biological dressing) として、前もって作製して保存してある同種由来の細胞を用いた人工表皮、人工真皮、人工皮膚も用いられるが、当然のことながら生着は期待できない。ただこのような場合においても一時的に創部に生着して、その間に細胞が放出するさまざまな成長促進因子により創部の創傷治癒過程が促進される<sup>8)</sup>。

また同種皮膚の細胞を用いる際に細胞プール由来の細胞を用いると、ケラチノサイトとファイブロブラストとが別々の人由来の細胞になってしまうことがある。用途によっては同一人由来のケラチノサイトとファイブロブラストがセットで販売されているのでこれを用いるよう注意が必要である。

##### 2) 培養液

培養する細胞それぞれに対して最適な培養液があり、ある細胞で最適でも他の細胞では増殖できずに最悪の場合死滅してしまうことがある。例えば皮膚においてケラチノサイトを皮膚から分離した際ファイブロブラストが若干混合してしまうことがある。

その場合でもケラチノサイト用の培養液で培養を続けると最終的にはケラチノサイトのみが得られる。

また一つの細胞でも増殖、分化それぞれに最適な培養液が必要なこともある。例えば脂肪細胞では増殖培地と分化培地は異なる。

したがって皮膚を構成するそれぞれの細胞に最適な培養液と、作製した人工皮膚に最適な培養液とは異なる。

また臨床に用いる場合には培養液に付加するウシ胎児血清に代表される生体由来成分にも注意が必要である。最近ではこれら生体由来成分に変わる合成物が入手可能となってきた。以前は合成物を用いると細胞増殖が遅かったが、最近では培養成績も向上している。

##### 担体 (Scaffold)

近年細胞の振る舞いはその周囲にあるECMによって変化することが知られてきた。細胞から組織を構築する場合、細胞のみを適切な方法で培養すれば自然に組織が構築される場合 (例えば表皮) と、細胞を播種するためのECMの代わりとなる足場 (培養担体) が必要になる場合 (例えば真皮) がある。担体が違えば細胞の振る舞いも変わるため適切な担体を選択する必要がある。

担体としてはコラーゲングル、コラーゲンスポンジ、フィブリン糊、無細胞化同種真皮マトリックス等多種多様のものが用いられてきたが、その多くは生体由来であり未知の病原体に対する安全性の観点からその臨床応用に対して議論がある。そこで最近では完全な合成物でその組成が明確なポリ乳酸、ペプチドハイドロゲルなどの合成担体を用いることが試みられている<sup>9)</sup> (Fig. 6)。

##### 3) 費用

研究室レベルにおいて組織工学的手法を用いて皮膚代替物を作製するには以下の各段階で多額の費用が必要となり、総計すると以外なほど高額となる。まず細胞を採取するための組織を入手する、入手した組織から必要な細胞を分離する、皮膚代替物を作製するために必要な各細胞を十分な細胞数まで増殖分化させる、細胞と担体を用いて皮膚代替物を3次元構築する、作製した皮膚代替物を使用出来る状態まで成熟させる費用である。

さらに皮膚代替物を臨床に用いるためにはGMP準拠の施設が必要となる。しかも上記の各段階で使



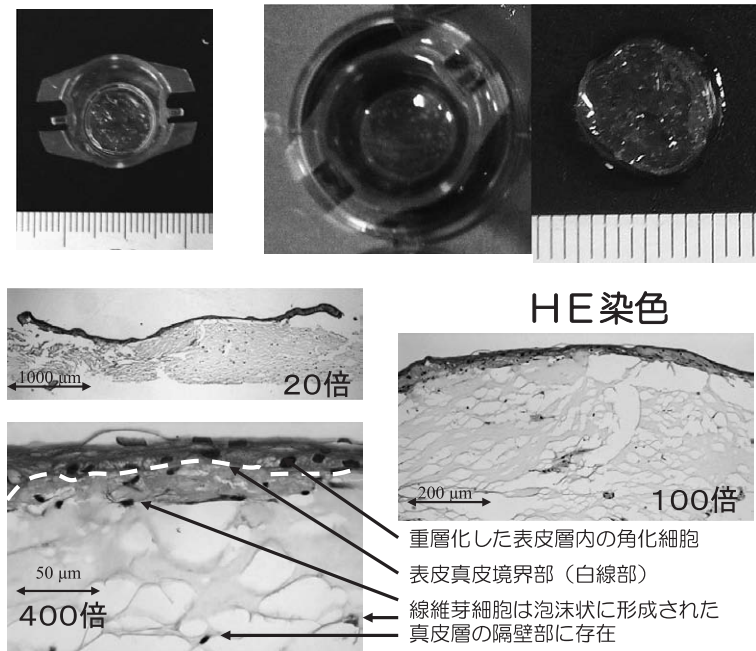


Fig. 6

用する培養液や薬剤についても GMP 準拠であることが望ましく、研究レベルで使用するものよりもさらに高額となる。その上各段階においてウイルスチェックなどの各種検査が必要であり、その検査記録ならびに使用記録の長期保存も必要となる。したがって出来上がった製品も高額となり、例えばジェイス®は8×10 cm（手のひら半分程度）1枚で約30万円となっている。

## 5. 今後の展望

再生医療はこの10年間で急速な進歩を遂げており、皮膚代替物も例外ではない。特にASCsは脂肪吸引という比較的簡便な方法で大量に採取可能であり、しかも採取部位にほとんど傷害を残さない。脂肪、骨、軟骨といった間葉系細胞への、多分化能を持つ細胞であり、皮膚と骨、軟骨との複合組織を作製することも可能となるであろう。

また毛、汗腺、皮脂腺などの皮膚付属器の再生も視野に入っている。特に毛の再生については世界中で多くの研究者が取り組んでおり、研究室レベルでは個々の毛乳頭ならびに毛幹の再生には成功している。現在のところ毛としては細く短いため臨床に用

いるまでには至らず、今後太く長くするための研究が続けられている。

さらに各種の成長促進因子やサイトカインをあらかじめ皮膚代替物に添加して皮膚の再構築を促進する研究が始まっている。たとえば線維芽細胞成長因子 (bFGF) はフィブラスプレー（科研製薬）として発売され、褥瘡や難治性潰瘍の治療に使用されているが、これを添加して母床との血管構築を促進させる研究が行われている。

## まとめ

組織工学を応用した皮膚代替物は改良が重ねられており、臨床的には熱傷や難治性潰瘍のような皮膚欠損創の治療への応用が期待されている。今後機能面、整容面での改良が加えられ、症例に応じた使用ガイドラインが確立されれば爆発的に普及していくであろう。

同時に皮膚代替物は薬の研究開発や化粧品などの試験における動物代替法としても注目されている。既に動物による試験を全廃して代替法に完全に移行した企業もある。今後はさらなる広がりを見せ標準的な試験方法として確立していくであろう。

文 献

- 1) Rheinwald JG and Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of ketatinizing colonies from single cells. *Cell* **6** : 331-343, 1975.
- 2) Groeber F, Holeiter M, Hampel M, *et al*: Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev* **63** : 352-366, 2011.
- 3) Trottier V, Marceau-Fortier G, Germain L, *et al*: IFATS collection: using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells* **26** : 2713-2723, 2008.
- 4) Vermette M, Trottier V, Menard V, *et al*: Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* **28** : 2850-2860, 2007.
- 5) 松田隆昌, 高見佳宏: 代用真皮の分類とその課題. 熱傷 **20** : 221-230, 1994.
- 6) 塚原真吾, 加王文祥, 寺瀬佳苗, ほか: 人工皮膚モデルを用いたマクロファージの創傷治癒過程における動態可視化の試み. 昭和医会誌 **70** : 164-173, 2010.
- 7) Hudon V, Berthod F, Black AF, *et al*: A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br J Dermatol* **148** : 1094-1104, 2003.
- 8) 副島一孝, 野崎幹弘, 片平次郎, ほか: 凍結保存同種培養表皮による新鮮 DDB の治療. 形成外科 **45** : 629-637, 2002.
- 9) Kao B, Kadomatsu K and Hosaka Y: Construction of synthetic dermis and skin based on a self-assembled peptide hydrogel scaffold. *Tissue Eng Part A* **15** : 2385-2396, 2009.